หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสังเคราะห์ 4-ไวนิลไกวอะคอลอย่างมีประสิทธิภาพด้วยการเปลี่ยนเชิงชีวภาพของกรดเฟอรูลิกโดยฟังไจไวท์รอท

ผู้เขียน นายกีรติ ตันเรือน

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

รศ. ดร นวลศรี รักอริยะธรรม	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ. ดร. ไพโรจน์ กิจจนะพานิช	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อ. ดร. นพกาญจน์ จันทร์เดช	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ในกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพ กรดเฟอรูลิกซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกราคาถูกและพบได้มากในผนังเซลล์ของพืชจะถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารให้กลิ่นชนิดต่าง ๆ โดยมียูลินทรีย์เป็นตัวเร่งชีวภาพ ในการศึกษานี้ฟังไจไวท์รอท 15 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ดั้งเดิม 3 สายพันธุ์ คือ *Ganoderma australe*, *G. mastosporum* และ *Trametes pavonia* และ สายพันธุ์การค้า 12 สายพันธุ์ ได้แก่ เห็ดหลินจือ เห็ดหอม เห็ดกระด้าง เห็ดขอนขาว เห็ดนางรม เห็ดนางรม (ภูฏาน) เห็ดนางรม (ฮังการี) เห็ดนางฟ้า เห็ดแครง เห็ดฟาง เห็ดกำมะหยี่แดง และเห็ดขอนแดงรูเล็ก ถูกศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนกรดเฟอรูลิกเป็นสารเมทาบอไลท์มูลค่าสูง ซึ่งตรวจสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ผลการตรวจสอบสารเมทาบอไลท์ที่เกิดขึ้น พบว่า เชื้อเห็ดฟางมีศักยภาพสูงในการเปลี่ยนกรดเฟอรูลิกเป็น 4-ไวนิลไกวอะคอล (88.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) กรดวานิลลิก (59.1 มิลลิกรัมต่อลิตร) และวานิลลิลแอลกอฮอล์ (39.7 มิลลิกรัมต่อลิตร) สารดังกล่าวได้มีการยืนยันโครงสร้างโมเลกุล โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-ไดโอดอเรย์ดีเทคเตอร์-อีเอสไอ- แมสสเปกโทรเมทรี เทียบกับสารมาตรฐาน ขณะที่พบวานิลลินปริมาณน้อย 3.6 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมถึงสารไม่ทราบชื่อในปริมาณน้อยหลายชนิด เชื้อฟังไจไวท์รอทอื่น ๆ ผลิตสารไม่ทราบชื่อหลายชนิดโดยไม่มีการผลิตวานิลลิน 4-ไวนิลไกวอะคอล กรดวานิลลิก และวานิลลิลแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาวิถีเมทาบอลิกที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นไปได้ในการเปลี่ยนกรดเฟอรูลิกของเชื้อเห็ดฟางโดยใช้สารตัวกลางมาเป็นสารตั้งต้นแทนที่กรดเฟอรูลิกและตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ซึ่งพบว่ากรดเฟอรูลิกสามารถถูกเปลี่ยนเป็น 4-ไวนิลไกวอะคอลและกรดวานิลลิก ซึ่งภายหลังกรดวานิลลิกจะถูกรีดิวซ์เป็นวานิลลิลแอลกอฮอร์ ขณะที่วานิลลิลแอลกอฮอร์สามารถเปลี่ยนกลับเป็นกรดวานิลลิก และวานิลลิน ส่วนวานิลลินสามารถเปลี่ยนเป็นกรดวานิลลิกและวานิลลิลแอลกอฮอร์ นอกจากนี้ได้มีการศึกษาอิทธิพลของสารประกอบซัลฟ์ไฮดริลซึ่งเป็นตัวรีดิวซ์ หลายชนิด ได้แก่ ซิสเทอีน, ซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรท, ไดไธโอธริอิทอล, กลูตาไทโอนและเมไทโอนีน ในการเพิ่มปริมาณการผลิต 4-ไวนิลไกวอะคอล จากการเปลี่ยนเชิงชีวภาพของกรดเฟอรูลิกด้วยเชื้อเห็ดฟาง พบว่าสารประกอบซัลฟ์ไฮดริลทุกชนิดสามารถเพิ่มปริมาณของ 4-ไวนิลไกวอะคอล ยกเว้น ไดไธโอธริอิทอล โดยซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรทสามารถเพิ่มปริมาณของ 4-ไวนิลไกวอะคอล (136.7 มิลลิกรัมต่อลิตร) คิดเป็น 47.9 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับการไม่ใช้สารดังกล่าว

จากศักยภาพของเชื้อเห็ดฟางในการเปลี่ยนกรดเฟอรูลิกเป็นสารเมทาบอไลท์มูลค่าสูงดังกล่าวมาแล้ว จึงได้มีการเลือกเชื้อเห็ดฟางมาใช้เป็นตัวเร่งชีวภาพในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต 4-ไวนิลไกวอะคอลจากกรดเฟอรูลิก ซึ่งได้แก่ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น, ระยะเวลาในการทดลอง, pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ, อายุของเชื้อเห็ดฟางและอุณหภูมิ พบว่า สามารถผลิต 4-ไวนิลไกวอะคอลได้สูงถึง 637.8 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดเฟอรูลิกเริ่มต้น 750 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 144 ชั่วโมงหลังจากการเติมกรดเฟอรูลิก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH 7.5 โดยใช้เชื้อเห็ดฟางอายุ 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมในการทดลองแล้วยังได้มีการศึกษาการเพิ่มปริมาณของ 4-ไวนิลไกวอะคอลโดยการใช้ซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรทภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่า การเติมซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรท (0.5 มิลลิโมลาร์) สามารถเพิ่มปริมาณของ 4-ไวนิลไกวอะคอลเป็น 671.8 มิลลิกรัมต่อลิตรที่เวลา 168 ชั่วโมงของการทดลอง

นอกจากนี้ได้มีการผลิต 4-ไวนิลไกวอะคอลจากสารสกัดกรดเฟอรูลิกจากเปลือกข้าวโพดโดยเชื้อเห็ดฟางในอาหารเลี้ยงเชื้อจากมัสตาร์ด พบว่า การใช้มัสตาร์ด 4 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตรและสารสกัดกรดเฟอรูลิกจากเปลือกข้าวโพด 10 และ 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิต 4-ไวนิลไกวอะคอลได้ 44.32 และ 53.52 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 120 และ 144 ชั่วโมง ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้นการเพิ่มปริมาณของเชื้อเห็ดฟางเป็น 2 เท่า สามารถเพิ่มปริมาณของ 4-ไวนิลไกวอะคอล เป็น 48.9 และ 56.3 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้สารสกัดกรดเฟอรูลิกจากเปลือกข้าวโพด 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเชื้อเห็ดฟางในการผลิต 4-ไวนิลไกวอะคอลทั้งจากสารมาตรฐานกรดเฟอรูลิกในอาหารเลี้ยงเชื้อเบซัล (basal medium) และกรดเฟอรูลิกผงที่สกัดได้จากเปลือกข้าวโพดในอาหารเลี้ยงเชื้อมัสตาร์ด นอกจากนี้การใช้สารประกอบซัลฟ์ไฮดริลโดยเฉพาะอย่างยิ่งซิสเทอีนไฮโดรคลอไรด์โมโนไฮเดรทสามารถเพิ่มศักยภาพของเชื้อเห็ดฟางในการผลิตสารเมทาบอไลท์ดังกล่าว

คำสำคัญ: การเปลี่ยนเชิงชีวภาพ กรดเฟอรูลิก 4-ไวนิลไกวอะคอล วานิลลิน กรดวานิลลิก วานิลลิลแอลกอฮอล์ ฟังไจไวท์รอท เปลือกข้าวโพด อาหารเลี้ยงเชื้อมัสตาร์ด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Efficient Synthesis of 4-Vinyl Guaiacol via Bioconversion of Ferulic Acid by White Rot Fungi

Author Mr. Keerati Tanruean

Degree Doctor of Philosophy (Biotechnology)

Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Nuansri Rakariyatham	Advisor
Asst. Prof. Dr. Pairoje Kijjanapanich	Co-advisor
Lect. Dr. Nopakarn Chandet	Co-advisor

ABSTRACT

In biotechnological processes, ferulic acid (an inexpensive phenolic compound that is extremely abundant in the cell walls of plants) has been commonly used as a substrate and employs microorganisms as a biocatalyst to produce various flavor compounds. In this study, 15 strains of white rot fungi, including three wild-type strains (*Ganoderma australe*, *G. mastosporum* and *Trametes pavonia*) and 12 commercial strains (*G. lucidum*, *Lentinula edodes*, *Lentinus polychrous*, *L. squarrosulus*, *Pleurotus ostreatus*, *P. ostreatus* (Bhutan), *P. ostreatus* (Hungary), *P. sajor-caju*, *Schizophyllum commune*, *Volvariella volvacea*, *Pycnoporus coccineus* and *P. sanguineus*), were investigated for their ability to convert ferulic acid into higher value metabolites, which was detected by HPLC.

The results showed that *V. volvacea* exhibited a high potential for the bioconversion of ferulic acid into 4-vinyl guaiacol (88.2 mg/L), vanillic acid (59.1 mg/L) and vanillyl alcohol (39.7 mg/L). The formations of these compounds were confirmed by comparing their chromatograms obtained from LC-DAD-ESI-MS with the authentic standard. Whereas, low contents of vanillin (3.6 mg/L) and various unknown compounds were found in the extracts of *L. edodes*. The other fungal strains used ferulic acid for their growth and generated small amounts of various unknown

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

compounds, and displayed no production of vanillin, 4-vinyl guaiacol, vanillic acid and vanillyl alcohol. Additionally, the possible pathway of the ferulic acid metabolism by *V. volvacea* was investigated using various intermediate substrates instead of ferulic acid and followed the conversion products from each conversion. It was noted that ferulic acid could be converted to 4-vinyl guaiacol and vanillic acid, of which the latter was then reduced to vanillyl alcohol. While vanillyl alcohol could be converted to vanillic acid and vanillin, vanillin could then be converted to vanillic acid and vanillyl alcohol. Moreover, the effects of various sulfhydryl compounds (cysteine, cysteine hydrochloride monohydrate, dithiothreitol, glutathione and methionine) on the enhancement of 4-vinyl guaiacol production from the bioconversion of ferulic acid by *V. volvacea* were determined. All sulfhydryl compounds could enhance the production of 4-vinyl guaiacol, except for dithiothreitol. Cysteine hydrochloride monohydrate displayed a 47.9% increase in 4-vinyl guaiacol production (136.7 mg/L) when compared with the control.

According to the high potential of *V. volvacea* in the bioconversion of ferulic acid to high value metabolites, this fungal strain was used as a biocatalyst in the study of the optimal conditions: substrate concentration, time of incubation, pH of the medium, age of inoculums and temperature. The maximum production of 4-vinyl guaiacol (637.8 mg/L) was achieved under an initial ferulic acid concentration of 750 mg/L, 144 hours of incubation, a pH of the medium at 7.5, the age of inoculums at 72 hours and a temperature of 30°C. Moreover, the enhancement of the production of 4-vinyl guaiacol was achieved by adding cysteine hydrochloride monohydrate and was also applied under the optimal conditions. The cysteine hydrochloride monohydrate (0.5 mM) could increase the 4-vinyl guaiacol concentration up to 671.8 mg/L at 168 hours of incubation.

In addition, the production of 4-vinyl guaiacol from ferulic acid powder extracted from corn husks by *V. volvacea* in mustard powder hydrolysate was studied. It was found that the use of 4%(v/v) mustard powder hydrolysate media with 10 and 20 g/L of ferulic acid from corn husk powder could produce 44.32 mg/L and 53.52 mg/L of 4-vinyl guaiacol at 120 and 144 hours, respectively. Moreover, doubling the amounts of

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

mycelia could extend the production of 4-vinyl guaiacol to 48.9 and 56.3 mg/L from 10 and 20 g/L of ferulic acid from corn husks powder at 96 hours, respectively.

The results from this study indicate that *V. volvacea* possessed a great potential for 4-vinyl guaiacol production from both the ferulic acid standard in basal medium and ferulic acid powder extracted from corn husks in mustard powder hydrolysate media. In addition, the use of sulfhydryl compounds, especially cysteine hydrochrolide monohydrate, could enhance the potential of *V. volvacea* in the production of this metabolite.

Keywords: bioconversion, ferulic acid, 4-vinyl guaiacol, vanillin, vanillic acid, vanillyl alcohol, white rot fungi, corn husks, mustard powder hydrolysate media

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved